

09.02.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 1 月 1 0 日
Date of Application:

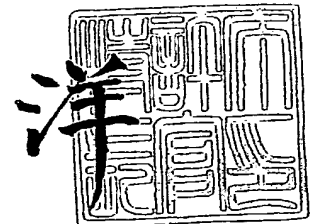
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 7 9 5 1 7
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 7 9 5 1 7]

出 願 人 財団法人新産業創造研究機構
Applicant(s):

2 0 0 5 年 3 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 5 9 5 6

【書類名】 特許願
【整理番号】 33210
【提出日】 平成15年11月10日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 21/35
G01N 21/25

【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区住吉山手7-1-331
【氏名】 ツェンコヴァ ルミアナ

【特許出願人】
【識別番号】 800000057
【氏名又は名称】 財団法人 新産業創造研究機構

【代理人】
【識別番号】 100085291
【弁理士】
【氏名又は名称】 鳥巢 実
【電話番号】 (078)392-5115

【選任した代理人】
【識別番号】 100117798
【弁理士】
【氏名又は名称】 中嶋 慎一

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 013583
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

試料検体に 400 nm～2500 nm までの又はその一部の波長領域の可視光及び／又は近赤外線を照射して試料検体のスペクトルを計測する工程と、前記スペクトルから吸収スペクトルを求めると共に得られた吸収スペクトル中のピークを分光学的手法により要素ピークに分解する工程と、その中の水分子の要素ピークを多変量解析して解析モデルを作成する工程とを備える分光分析方法において、

前記試料検体のスペクトルを計測する工程が、前記試料検体に所定の条件を付加することで摂動を与えながら、該摂動により生じる水分子の要素ピークの応答の変化を捉える構成であることを特徴とする可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 2】

試料検体に 400 nm～2500 nm までの又はその一部の波長領域の可視光及び／又は近赤外線を照射して試料検体のスペクトルを計測する工程と、前記スペクトルから吸収スペクトルを求めると共に得られた吸収スペクトル中のピークを分光学的手法により要素ピークに分解する工程と、その中の水分子の要素ピークを多変量解析して解析モデルを作成する工程とを備える分光分析方法において、

前記試料検体に所定の条件を付加することで摂動を与えながら前記試料検体のスペクトル測定を行い、PLS 法及び／又はクロスバリデーション法を用いて成分の特性を数値化する定量的解析もしくは PCA 法及び／又は SIMCA 法を用いてクラス判別を行う定性的解析する多変量解析を行い、前記摂動により生じる水分子の要素ピークの応答の変化を捉えて、前記試料検体の成分の判別及び／又は成分の特性を測定可能とするモデルを構築する構成としたことを特徴とする可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 3】

前記所定の条件が、濃度希釈、光の繰り返し照射、照射時間の延長、電磁力付加、光路長変更、温度、pH、圧力のいずれか、または、それらの組み合わせであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 4】

試料検体それぞれの濃度を 10 倍ずつ段階的に希釈して、400 nm～2500 nm の波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行い、前記試料検体中のバクテリアの CNS（コアグラゼ陰性ブドウ球菌）と CPS（コアグラゼ陽性ブドウ球菌）の判別を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 5】

金属成分を含むプリオン蛋白質 PrP (Cu) と PrP (Mn) と金属成分を含まないプリオン蛋白質 PrP の判別を行う際に、試料検体それぞれの濃度を段階的に希釈して、400 nm～2500 nm の波長範囲の分光分析を行うと共に、時間間隔を空けて繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 6】

試料検体中の抗体の濃度を測定する際に、前記抗体の濃度を段階的に希釈して、400 nm～2500 nm の波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 7】

試料検体中に溶解した粒子の溶解前の粒子径を測定する際に、各粒子径の粒子を溶解する濃度を段階的に希釈して、400 nm～2500 nm の波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 8】

試料検体中の異なるバクテリアを判別する際に、前記バクテリアの濃度を段階的に希釈して、400 nm～2500 nm の波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光

分析を行い、前記異なるバクテリアの判別を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 9】

牛等の哺乳動物の生乳を 400 nm～2500 nm の波長範囲の光により分光分析を行うと共に、一日に少なくとも朝夕各 1 回の分光分析を複数日連続して行いデータ解析を行うことで前記生乳から、前記牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液の成分濃度を予測可能としたことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 10】

牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液を 400 nm～2500 nm の波長範囲の光により分光分析を行うと共に、一日に少なくとも朝夕各 1 回の分光分析を複数日連続して行いデータ解析を行うことで前記生体液から、前記牛等の哺乳動物の生乳の成分濃度を予測可能としたことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 11】

生乳の複数の成分の濃度を測定する際に、光路長を変更して複数回の測定を行うと共に、700 nm～1100 nm の第一の波長範囲と、1100 nm～2400 nm の第二の波長範囲において、前記第 1 の波長範囲のみの又は前記第 1、第 2 の波長範囲の分光分析を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 12】

生乳中の脂肪濃度を測定する際に、10 V の電圧を付加した状態で、500～1000 nm の波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【請求項 13】

マヨネーズ等のクリーム状あるいは乳化状の製品の成分の特性を測定する際に、600 nm～1100 nm の波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射すると共に、それぞれの照射時間を変化させて分光分析を行い、前記クリーム状あるいは乳化状の製品の成分の特性を測定することを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の可視光・近赤外分光分析方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】可視光・近赤外分光分析方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、可視光及び／又は近赤外線を利用して各試料中の成分の判別や成分の特性を測定する分光分析方法に関し、特に、得られる吸収スペクトルを多変量解析して、各成分の判別や各成分の特性を測定する可視光・近赤外分光分析方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

最近では、種々の分野で近赤外線を用いた成分分析が行われている。例えば、可視光及び／又は近赤外線を検体試料に照射して、特定成分に吸収される波長帯を検出することで、前記特定成分を定量分析することが行なわれている。

【0003】

これは、例えば石英セル中に試料を注入し、これに近赤外分光器（例えば、ニレコ社製近赤外分光器NIRSystem6500）を用いて、400nm～2500nmの波長範囲の可視光及び／又は近赤外線を照射して、その透過光、反射光、又は透過反射光（以後これらを総称して透過反射光と称する）を分析することで行う。

【0004】

一般に、近赤外線は、物質の吸光係数が非常に小さく散乱を受け難く、エネルギーの低い電磁波であるので、試料にダメージを与えることなく化学的・物理的情報を得ることができる。

【0005】

そのために、試料検体からの透過反射光スペクトルの強度を検出して、試料検体による吸光度を求めて、得られた吸光度データを多変量解析することで、直ちに試料検体の情報を得ることができ、生体分子の構造や機能の変化の過程を直接的にリアルタイムに捉えることができる。

【0006】

そして、試料検体に400nm～2500nmまでの又はその一部の領域の連続波長光を照射して試料検体のスペクトルを得る工程と、得られたスペクトル中のピークを分光学的手法により要素ピークに分解する工程と、その中の水分子の要素ピークを多変量解析して解析モデルを作成する工程とを備えるとした試料検体の情報を得る方法が既に公開されている（例えば、特許文献1参照）。

【0007】

さらに、可視光及び／又は近赤外線領域における水分子の吸収バンドを用いて、得られた吸光度データを多変量解析することで、牛乳／又は乳房中の体細胞を測定して牛の乳房炎の診断を行うとした出願も公開されている（例えば、特許文献2参照）。

【特許文献1】特開2002-5827号公報（第1-9頁、第1図）

【特許文献2】国際公開WO01/75420号公報（第1-5頁、第1図）

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

従来の可視光及び／又は近赤外線を用いた成分分析方法においては、特定条件下で400nm～2500nmの波長範囲の光を照射し、試料中に存在する水分子と被検体中の注目成分との相互作用で水分子の要素ピークがシフトするのを検出することで、被検体の成分情報を得る方法であり、測定できる成分や測定の精度には限界がある。

【0009】

本発明の目的は、上記問題点を解消するために、400nm～2500nmの波長範囲の光を利用して各試料中の成分の判別や成分の特性を測定する分光分析方法において、従来の方法では判別困難なものを判別可能とし、成分特性の高精度な測定を可能とし、また超低濃度成分の検出を可能とし、さらに成分の特性をリアルタイムに測定可能とする可視

光・近赤外分光分析方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記の目的を達成するために請求項1に係る発明は、試料検体に400nm～2500nmまでの又はその一部の波長領域の可視光及び／又は近赤外線を照射して試料検体のスペクトルを計測する工程と、前記スペクトルから吸収スペクトルを求めると共に得られた吸収スペクトル中のピークを分光学的手法により要素ピークに分解する工程と、その中の水分子の要素ピークを多変量解析して解析モデルを作成する工程とを備える分光分析方法において、前記試料検体のスペクトルを計測する工程が、前記試料検体に所定の条件を付加することで摂動を与えながら、該摂動により生じる水分子の要素ピークの応答の変化を捉える構成であることを特徴としている。

【0011】

上記の構成を有する請求項1に係る発明によれば、摂動 (perturbation) を与えながら試料検体の各成分に応じてシフトする所定の水分子の応答の変化を測定して分光分析を行うので、従来検出不可能であった成分の判別または濃度や粒子の大きさ等の各成分の特性を測定することができる。

【0012】

請求項2に係る発明は、試料検体に400nm～2500nmまでの又はその一部の波長領域の可視光及び／又は近赤外線を照射して試料検体のスペクトルを計測する工程と、前記スペクトルから吸収スペクトルを求めると共に得られた吸収スペクトル中のピークを分光学的手法により要素ピークに分解する工程と、その中の水分子の要素ピークを多変量解析して解析モデルを作成する工程とを備える分光分析方法において、前記試料検体に所定の条件を付加することで摂動を与えながら前記試料検体のスペクトル測定を行い、PLS法及び／又はクロスバリデーション法を用いて成分の特性を数値化する定量的解析もしくはPCA法及び／又はSIMCA法を用いてクラス判別を行う定性的解析する多変量解析を行い、前記摂動により生じる水分子の要素ピークの応答の変化を捉えて、前記試料検体の成分の判別及び／又は成分の特性を測定可能とするモデルを構築する構成とした可視光・近赤外分光分析方法であることを特徴としている。

【0013】

上記の構成を有する請求項2に係る発明によれば、摂動 (perturbation) を与えながら試料検体の各成分に応じてシフトする所定の水分子の応答の変化を測定して分光分析を行い多変量解析を行うので、スペクトルのグラフからは直接判別できない応答の変化を捉えることができ、従来の方法では判別困難なものを判別可能とし、成分特性の高精度な測定を可能とし、さらに超低濃度成分の検出を可能とし、成分の特性をリアルタイムに測定可能とする精度の高いモデルをリアルタイムに得ることができる。

【0014】

請求項3に係る発明は、前記所定の条件が、濃度希釈、光の繰り返し照射、照射時間の延長、電磁力付加、光路長変更、温度、pH、圧力のいずれか、または、それらの組み合わせであることを特徴としている。

【0015】

上記の構成を有する請求項3に係る発明によれば、試料検体の種類に応じた条件を変えることで所定の摂動 (perturbation) を与えることができる。

【0016】

請求項4に係る発明は、試料検体それぞれの濃度を10倍ずつ段階的に希釈して、400nm～2500nmの波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行い、前記試料検体中のバクテリアのCNS (コアグラゼ陰性ブドウ球菌) とCPS (コアグラゼ陽性ブドウ球菌) の判別を行うことを特徴とする。

【0017】

上記の構成を有する請求項4に係る発明によれば、試料検体中のバクテリアのCNS (コアグラゼ陰性ブドウ球菌) とCPS (コアグラゼ陽性ブドウ球菌) とを判別する高

精度なモデルを構築することができる。

【0018】

請求項5に係る発明は、金属成分を含むプリオン蛋白質PrP(Cu)とPrP(Mn)と金属成分を含まないプリオン蛋白質PrPの判別を行う際に、試料検体それぞれの濃度を段階的に希釈して、400nm～2500nmの波長範囲の分光分析を行うと共に、時間間隔を空けて繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする。

【0019】

上記の構成を有する請求項5に係る発明によれば、間隔を空けて（例えば15分毎に）光を繰り返し照射するという摂動（perturbation）を与えることで、金属成分を含まないプリオン蛋白質PrPと金属成分を含むプリオン蛋白質PrP(Cu)とPrP(Mn)とを判別することができるモデルを構築することができる。

【0020】

請求項6に係る発明は、試料検体中の抗体の濃度を測定する際に、前記抗体の濃度を段階的に希釈して、400nm～2500nmの波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする。

【0021】

上記の構成を有する請求項6に係る発明によれば、抗体濃度を段階的に希釈するという摂動（perturbation）と、複数回連続照射するという摂動（perturbation）を与えることで試料検体中の抗体濃度を測定可能となるモデルを構築することができる。

【0022】

請求項7に係る発明は、試料検体中に溶解した粒子の溶解前の粒子径を測定する際に、各粒子径の粒子を溶解する濃度を段階的に希釈して、400nm～2500nmの波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする。

【0023】

上記の構成を有する請求項7に係る発明によれば、各粒子径の粒子を溶解する濃度を段階的に希釈するという摂動（perturbation）と、複数回連続照射するという摂動（perturbation）を与えることで溶解前の粒子径を測定可能なモデルを構築することができる。

【0024】

請求項8に係る発明は、試料検体中の異なるバクテリアを判別する際に、前記バクテリアの濃度を段階的に希釈して、400nm～2500nmの波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行い、前記異なるバクテリアの判別を行うことを特徴とする。

【0025】

上記の構成を有する請求項8に係る発明によれば、バクテリア濃度を段階的に希釈するという摂動（perturbation）と、複数回連続照射するという摂動（perturbation）を与えることで試料検体中の異なるバクテリアを判別可能とするモデルを構築することができる。

【0026】

請求項9に係る発明は、牛等の哺乳動物の生乳を400nm～2500nmの波長範囲の光により分光分析を行うと共に、一日に少なくとも朝夕各1回の分光分析を複数日連続して行いデータ解析を行うことで前記生乳から、前記牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液の成分濃度を予測可能としたことを特徴とする。

【0027】

上記の構成を有する請求項9に係る発明によれば、測定間隔と測定回数を変化させるという摂動を与えながら、牛等の哺乳動物の生乳を分光分析することで、前記牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液に含有される成分濃度を予測し測定することができ、牛等の生態情報を容易に取得可能なモデルを構築することができる。

【0028】

請求項10に係る発明は、牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液を400nm～2500nmの波長範囲の光により分光分析を行うと共に、一日に少なくとも朝夕各1回の分

光分析を複数日連続して行いデータ解析を行うことで前記生体液から、前記牛等の哺乳動物の生乳の成分濃度を予測可能としたことを特徴とする。

【0029】

上記の構成を有する請求項10に係る発明によれば、測定間隔と測定回数を変化させるという摂動を与えながら、牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液を分光分析することで、前記牛等の哺乳動物の生乳に含有される成分濃度を予測し測定することができ、生乳の品質特性を容易に判定可能なモデルを構築することができる。

【0030】

請求項11に係る発明は、生乳の複数の成分の濃度を測定する際に、光路長を変更して複数回の測定を行うと共に、700nm～1100nmの第一の波長範囲と、1100nm～2400nmの第二の波長範囲において、前記第1の波長範囲のみの又は前記第1、第2の波長範囲の分光分析を行うことを特徴とする。

【0031】

上記の構成を有する請求項11に係る発明によれば、光路長を変更して分光分析することで、短波長領域の第一の波長範囲においても、成分の濃度を測定可能な高精度のモデルを構築することができる。

【0032】

請求項12に係る発明は、生乳中の脂肪濃度を測定する際に、10Vの電圧を付加した状態で、500～1000nmの波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射しながら分光分析を行うことを特徴とする。

【0033】

上記の構成を有する請求項12に係る発明によれば、電圧を付加して電磁場を変化させるという摂動 (perturbation) と、複数回連続照射するという摂動 (perturbation) を与えることで牛乳中の脂肪濃度を高精度に測定可能なモデルを構築することができる。

【0034】

請求項13に係る発明は、マヨネーズ等のクリーム状あるいは乳化状の製品の成分の特性を測定する際に、600nm～1100nmの波長範囲の光を複数回連続繰り返し照射すると共に、それぞれの照射時間を変化させて分光分析を行い、前記クリーム状あるいは乳化状の製品の成分の特性を測定することを特徴とする。

【0035】

上記の構成を有する請求項13に係る発明によれば、複数回連続照射するという摂動 (perturbation) と、それぞれの照射時間を変化させるという摂動 (perturbation) を与えることで、マヨネーズ等のクリーム状あるいは乳化状の製品中の成分の特性を測定可能なモデルを構築することができる。

【発明の効果】**【0036】**

本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法によれば、試料に所定の条件を付加することで摂動 (perturbation) を与えながら試料検体の各成分に応じてシフトする所定の水分子の応答の変化を測定して分光分析を行い多変量解析を行うので、スペクトルのグラフからは判別できない応答の変化を捉えることができ、従来の方法では判別困難なものを判別可能とし、成分特性の高精度な測定を可能とし、また超低濃度成分の検出を可能とし、さらに成分の特性をリアルタイムに測定可能となる精度の高いモデルを得ることができる。

【発明を実施するための最良の形態】**【0037】**

超低濃度成分の検出や成分の判別及び／又は成分の特性をリアルタイムに測定可能な可視光・近赤外分光分析方法を得るという目的を、試料検体に所定の条件を付加することで摂動 (perturbation) を与えながら分光分析を行い、得られた多数の測定データから、水分子による所定の吸光バンドを選択して、PLS法及び／又はクロスバリデーション法を用いて成分特性を数値化する定量的解析もしくはPCA法及び／又はSIMCA法を用いてクラス判別を行う定性的解析する多変量解析によりモデルを構築することで、試料検体

の成分の検出や判別及び／又は成分の特性を測定可能とするものである。

(実施の形態)

【0038】

以下、本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法の実施の形態について、図1から図21に基づいて説明する。

【0039】

本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法は、市販の分光分析器（例えば、ニレコ社製近赤外分光器NIRSystem6500）を用いて、400nm～2500nmまでの又はその一部の領域の連続波長光（可視光及び／又は近赤外線）を照射して得られる透過反射光のスペクトルを解析することで行う。

【0040】

スペクトルの解析とは、検出されたスペクトルを吸収スペクトルに変換するために、光反射率の逆数を対数変換し、得られたスペクトル中のピークを分光学的手法により要素ピークに分解し、該要素ピーク中の水分子の要素ピークを多変量解析し、帰属バンドを求めて、モデルを構築することである。

【0041】

近赤外光を試料検体（液状試料）に照射すると、対象物に含まれる各種分子により特定の波長のみが吸収される。そして、分子構造（分子の種類）により吸収される光の波長が異なる。液状試料のように水分子が含まれるものでは、水分子に特有の波長バンド帯にて複雑な吸光現象が起こる。また、水分子と被検体中の注目成分との相互作用で水分子の要素ピークがシフトする。

【0042】

そのために、得られたスペクトルの検出吸光度（光の吸収される度合い）を波長ごとにプロットすることにより近赤外吸収スペクトルが得られ、この近赤外吸収スペクトルを用いて定量分析を行うには、目的特性の値（濃度或いは特性値）とスペクトルデータとを関係づける関係式（検量線）が必要となる。通常検量線は、目的特性値が既知な試料のスペクトルを計測し、そのスペクトルデータを、オートスケール、スムージング処理、一次微分処理等の前処理を行った後で、部分二乗回帰分析（PLS）により演算して得ることができる。さらに、クロスバリデーションにより検証を行いながら高精度なモデルを構築することができる。また、主成分分析（PCA）により成分の判別を行うと共に、得られた各モデル間の距離をSIMCA法にて検定することができる。

【0043】

上記の前処理や多変量解析等のデータ解析には、Pirouette3.02（GLサイエンス社製）のデータ処理ソフトを使用した。

【0044】

近赤外分光分析ではエネルギーレベルが弱いので同一物質に繰り返し照射しても物性、構造に悪影響を与えず、所定の条件（摂動：perturbation）を加えながら分光分析を行うことができる。そのために、得られた多くの微小な変動データを多変量解析することで、今まで検知不能であった成分の判別や成分の特性が検知できるようになった。

【0045】

本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法の流れを図1に示す。既知の試料1に所定の条件を付加することで摂動を与えながら、スペクトル測定を行う。得られたスペクトルをデータ変換・データ解析を行い、吸収バンドの強度の違いを検証しながら所定の試料の帰属バンドを求めてモデルを構築するものである。また、新たな試料2に同様な摂動を与えながらスペクトルをリアルタイムモニタリングして前記モデルと比較することで、モデルの実証性を評価する流れである。

【0046】

上記の分光分析器を用いて波長領域400nm～2500nmを波長分解能2nmで走査すると、1走査で1051個のデータを取り込むことができる。また、連続的に3回走査すると3153個のデータが得られると共に、それらをデータ処理すると、水分子の所

定の要素ピークに各成分との相互作用によるシフトが各種の波長域に現れていることが判る。

【0047】

図2に水分子の吸収バンドの強度変化を示すが、これは15分毎に6時間400nm～2500nmの連続波長光を水のための試料検体に照射した際に、強度変化を生じるつまりシフトが生じる波長バンドを示している。つまり、黒く塗りつぶした部分のバンドにて応答(response)が生じていることが判る。

【0048】

試料検体を分光分析した際に生じる水分子の所定の要素ピークの応答(response)は、前記試料検体の成分に応じてそのシフトする波長バンドが変化している。また、この変化の程度は、得られるスペクトルデータからは判別されず、多変量解析によるデータ処理を行って初めて確認される。

【0049】

さらに、試料の成分濃度を段階的に変化させて走査しても、光路長を変化して走査しても、温度やpH等の外的条件を付加して走査しても、一回目と二回目、あるいは二回目と三回目とでその応答が僅かに変化しており、各試料成分に応じた水分子の所定の要素ピークに応答(response)の変化(シフト)が生じていることが判る。

【0050】

つまり、試料検体に濃度希釈、光の繰り返し照射、照射時間の延長、電磁力付加、光路長変更、温度、pH、圧力等の所定の条件を付加して摂動を与えながら走査することで、各試料の成分に応じた応答(水分子の所定の要素ピークの変動)を検知可能であることが明らかとなった。

【0051】

以下に各試料の測定結果について説明する。

【実施例1】

【0052】

実施例1は、試料検体中のバクテリアのCNS(コアグラゼ陰性ブドウ球菌)とCPS(コアグラゼ陽性ブドウ球菌)の判別とそれぞれの濃度を測定した例であって、緩衝液BPW(Buffer peptone water)中にそれぞれのバクテリアを混入した試料検体を生成し、石英セル1mmに前記試料検体を注入して、それぞれの濃度を 10^{-1} CPU(コロニー/ユニット)から 10^{-10} CPUまで10倍段階的に希釈しながら、400nm～2500nmの波長範囲の光を3回連続して繰り返し照射し分光分析を行い、2nm間隔の測定を行った例である。

【0053】

また、それぞれのバクテリアを判別する際には、試料検体として、前記緩衝液に替えて、牛乳中にそれぞれのバクテリアを混入した試料検体を採用してもよい。また、シャーレに培養したバクテリアをそのまま測定することも可能である。

【0054】

この時に使用した分光分析器はニレコ社製近赤外分光器NIRSystem6500であり、測定温度は37℃の一定温度とした。

【0055】

図3には測定された吸収スペクトルを示しているが、網掛け部はノイズとしてデータから除去した部分を示している。この得られたデータを、Pirouette3.02(GLサイエンス社製)のデータ処理ソフトを用いて、オートスケール、スムージング処理、一次微分処理の各種の前処理、及び変換を行った後で、PLSとクロスバリデーション解析によりそれぞれのバクテリアの濃度を測定するモデルを作成し検証を行う。また、主成分分析(PCA)とSIMCA解析によりそれぞれの試料検体中のバクテリアの判別を行う。

【0056】

ここで、図4には解析の結果得られたCNSの濃度の回帰ベクトルを示し、図5にはCPSの濃度の回帰ベクトルを示している。さらに、図6にCNSの濃度の検量線を示し、

図7にはCPSの濃度の検量線を示している。

【0057】

上記検量線を示す図は、測定値（従来法による測定値）をX軸（横軸）とし、多変量解析して構築されるモデルから得られる予想値をY軸（縦軸）とした図である。

【0058】

ここで、図6に示すCN⁶⁻²とは、CNSの濃度が10⁻⁶CPUの試料検体の2回目の走査データであることを示している。同様に図7に示すCP⁶⁻³とは、CPSの濃度が10⁻⁶CPUの試料検体の3回目の走査データであることを示している。

【0059】

図6および図7から判るように、CNSとCPSとをその濃度が10⁻¹CPUから10⁻¹⁰CPUまでの範囲で測定可能な検量線を得ることが可能であり、特に人体に有害なバクテリアであるCPSを、その濃度が10⁻¹⁰CPUと超低濃度の場合でも確実に測定することができる。

【0060】

さらに、図8にはクロスバリデーションの解析結果を示しており、バリデーション誤差SEVとバリデーションの相関r_{Val}等の結果を表示している。この結果から、例えばCPSの検量線においては、Factor6の累積寄与率(cumulative)は97.56091%であり、その時のバリデーション誤差SEVが3.096218であることを示している。また、その時の相関係数r_{Val}=0.944926となり、精度の高い検量線が得られた。

【0061】

また、CNSとCPSとを混入した混合液の濃度を段階的に希釈したサンプルを用いて前記CNSとCPSとの判別を行った。各サンプルに対して3回測定したスペクトルのうち、2, 3回目の測定データを用いて使用波長領域からノイズをカットしたサンプル群において主成分分析(PCA)を行い、前記PCAにより得られた第1主成分(Factor1)、第3主成分(Factor3)、第5主成分(Factor5)に基づく3次元プロットを図9に示している。この図から判るように、本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法によれば、境界L1を境にCNSとCPSのクラスターを明確に分離することができる。つまり、従来困難であったCNSとCPSとの判別が、本実施例に係る可視光・近赤外分光分析方法により容易に判別することができる。

【0062】

図10(a)には各前処理や変換処理を変更した際のSIMCA解析の結果を示している。それぞれの測定条件A-1~A-6に示している、水、BPW、希釈サンプル、ノイズ除外、3回とは、それぞれ、水分子のスペクトルを除去、緩衝液BPWを使用、段階的に希釈した試料を使用、ノイズ除去処理、3回連続照射であることを示している。

【0063】

また、Autoscaleとはオートスケール処理のことであり、smooth(15)とは15nm毎にスムージング処理したことであり、1st Derivative(25)とは25nm毎に一次微分処理したことをそれぞれ示している。

【0064】

つまり、測定条件A-6に示す、水分子のスペクトルを除去、緩衝液BPWを使用、段階的に希釈した試料を使用、ノイズ除去処理、3回連続照射の測定条件において、オートスケール、スムージング処理(15nm毎に)、一次微分(25nm毎に)のデータ処理を行いSIMCA解析した場合にCNSとCPSとのクラス間距離が4.254であることがわかる。

【0065】

一般に前記クラス間距離が3以上であればクラス判別が有意とされており、上記で得られたクラス間距離が4.254なので、CNSとCPSを十分に判別可能なSIMCAモデルが得られたことが判る。

【0066】

また、図10(b)にはSIMCAを使った判別結果を示しており、例えばCNSでは34回全て判別成功であり、CNSでないと誤判別した例は0回であった。またCPSでは36回全て判別成功であり、CPSでないと誤判別した例は0回であり、判別誤差が生じていないことを示している。

【0067】

上記したように、摂動 (perturbation) として、試料濃度の段階的な希釈と、3回繰り返し照射という条件変化を与えながらの分光分析により、試料検体中のバクテリアのCNS (コアグラゼ陰性ブドウ球菌) とCPS (コアグラゼ陽性ブドウ球菌) の判別と濃度測定に対して高精度なモデルを構築することが可能となった。

【0068】

そのために、本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法により、判別が困難で人体に有害なバクテリアを確実に判別することができ、従来の培養法によれば48時間程度のバクテリア培養時間が必要であったものが、本発明によれば、培養する必要もなくリアルタイムに測定することができるという効果が得られる。

【実施例2】

【0069】

実施例2は、金属成分を含まないプリオン蛋白質PrPと金属成分を含むプリオン蛋白質PrP (Cu) とPrP (Mn) の判別を行なった例であって、400nm~2500nmの波長範囲の光により分光分析を行うと共に、光を15分毎に6時間繰り返し照射して分光分析を行い、PCA法とSIMCA法により多変量解析を行ったものである。

【0070】

また、プリオン蛋白質PrPのみの試料と分子構造内に銅を含有する試料PrP (Cu) と分子構造内にマンガンを含有する試料PrP (Mn) とをそれぞれ準備し、さらに、それぞれの濃度を、1mg/ml、0.5mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/mlと変化させた複数の希釈サンプルをそれぞれ分光分析した。

【0071】

得られたスペクトルをPCA法 (主成分分析) により多変量解析を行い、その時に得られた第1主成分 (Factor1)、第3主成分 (Factor3)、第5主成分 (Factor5) による判別結果およびローディングを図11に示す。

【0072】

図11(a)は第1主成分 (Factor1) と第3主成分 (Factor3) によるPrPとPrP (Cu) とPrP (Mn) との判別結果であり、図11(b)は第3主成分 (Factor3) と第5主成分 (Factor5) によるPrPとPrP (Cu) とPrP (Mn) との判別結果を示している。また、図11(c)はそれぞれの主成分のローディングを示している。

【0073】

図11(a)からPrPとPrP (Cu) とPrP (Mn) とが明確に判別されていることが明らかである。ただ、図中に示すPrP1が破線で囲むPrPグループから離れており、Cu1がPrP (Cu) グループから離れており、Mn1がPrP (Mn) グループから離れていることが判る。前記PrP1、Cu1、Mn1とはそれぞれ一回目の照射時のデータであって、一回だけでは正確な判別を行うことができず、摂動 (perturbation) を与えながら繰り返し測定することで、グループ判別が可能となるモデルが得られることを示している。

【0074】

図11(a)(b)から明らかのように、摂動 (perturbation) として、試料濃度の段階的な希釈と、光を15分毎に繰り返し照射という条件変化を与えながら分光分析を行うと、プリオン蛋白質PrPとPrP (Cu) とPrP (Mn) との判別が可能となるモデルを得ることができる。

【0075】

図11(c)から判るように、第1主成分 (Factor1) を構成するファクターとしては第1主成分 (Factor1) のローディングを示すラインPC1により1466nmの波長光

の寄与が大きく、第3主成分 (Factor3) のローディングを示すラインPC3により1340 nm、1424 nmの波長光の寄与が大きく、第5主成分 (Factor5) のローディングを示すラインPC5により1364 nm、1394 nm、1476 nmの波長光の寄与が大きいことが判る。

【0076】

また、SIMCA解析を行い、各クラス間の距離を算出した結果を図12に示す。この図から、PrP (Cu) とPrP (Mn) と距離が28.81であり、PrP (Cu) とPrPとの距離が4.15であることが判る。前に説明したようにこの距離が3以上であれば、クラス判別が有意であるので、本方法によりプリオン蛋白質を明確に判別することが可能となる。

【0077】

つまり、光を時間間隔を空けて (15分毎に) 繰り返し照射する摂動 (perturbation) を与えながら分光分析を行うことで、PrP (Cu) とPrP (Mn) などの金属分子を含有した蛋白を検出可能となり、プリオン蛋白質PrPと、狂牛病に関係あると見られているプリオン蛋白質PrP (Cu) とを確実に判定可能なモデルを得ることができる。

【実施例3】

【0078】

実施例3は、試料検体中の抗体濃度を測定した例であって、抗体としてAnti-bisphenol A scFvを用い、抗原としてBisphenolAを用いて、緩衝液 (PBSバッファー) 中にそれぞれの濃度を段階的に希釈した希釈サンプルを試料検体として、光路長1mmの石英セルに注入し、400 nm~2500 nmの波長範囲の光を3回連続繰り返し照射して分光分析を行ったものである。

【0079】

前記抗体の希釈サンプルは10 ng/ml、100 ng/ml、1 µg/ml、10 µg/mlの4段階であった。また、前記抗原の濃度は、1 pg/ml~100 ng/mlまでの6段階の希釈サンプルを使用した。また、それぞれを混ぜ合わせて合計58サンプルの分光分析を行った。

【0080】

得られたスペクトルデータをノイズ処理、スムージング処理、オートスケール処理を行い、PLS法とクロスバリデーション解析を行った。

【0081】

解析結果を図13に示す。図13 (a) は検量線であり、横軸Measured Yが従来法による測定値を示し、縦軸Pred Calが本発明による可視光・近赤外分光分析方法により得られた予測値を示している。この結果から、抗体の濃度が1 ppt (1兆分の1) の濃度まで測定可能であることが判った。

【0082】

またクロスバリデーション解析により得られるバリデーション誤差SEVを図13 (b) に示しているが、1回の照射によるFactor5の累積寄与率 (cumulative) は99.94188%であり、その時のバリデーション誤差SEVが3.558607であることを示している。しかし、3回繰り返し照射によるFactor9の累進寄与率が99.94567%の場合に、バリデーション誤差SEVが1.008785であることを示している。

【0083】

つまり、複数回 (3回) 連続繰り返し照射による摂動 (perturbation) を与えながらの分光分析により、従来の3倍の精度で試料検体中の抗体濃度を測定可能となることが判った。

【実施例4】

【0084】

実施例4は、試料検体中に溶解した粒子の溶解前の粒子径を測定する例として、溶解前のコーヒー粒子径を測定した実施例であって、ミキサーによってインスタントコーヒーを粉碎する際に、0秒、20秒、60秒、90秒とその粉碎時間を延長して、コーヒーの粒

子径を段階的に粉碎して細かくしていったサンプルを用いると共に、それぞれの濃度を段階的に希釈した希釈サンプルを光路長 1 mm の石英セルに注入し、400 nm ~ 2500 nm の波長範囲の光を 3 回連続繰り返し照射して分光分析を行ったものである。

【0085】

得られたスペクトルデータをノイズ処理、スムージング処理、オートスケール処理を行い、PLS法とクロスバリデーション解析を行った。

【0086】

解析結果を図 14 に示す。図 14 (a) は横軸 Measured Y が従来法による測定値を示し、縦軸 Pred Cal が本発明による可視光・近赤外分光分析方法により得られた予測値を示している。前記測定値 Y は実際にコーヒー粒子の径を測定したものではなく、粉碎時間の対数表示としている。これは粉碎時間が長いと粒子径が小さくなると見なしたものである。この結果から、本発明によれば、溶解前のコーヒー粒子径を推測できるモデルが得られることが判った。

【0087】

またクロスバリデーション解析により得られるバリデーション誤差 SEV を図 14 (b) に示しているが、1 回の照射による Factor5 の累積寄与率 (cumulative) は 98.31849% であり、その時のバリデーション誤差 SEV が 0.937039 であることを示している。しかし、3 回繰り返し照射による Factor6 の累進寄与率が 99.8904% の場合に、バリデーション誤差 SEV が 0.466675 であることを示している。

【0088】

つまり、3 回連続繰り返し照射による摂動 (perturbation) を与えながらの分光分析により 1 回のみの照射による分光分析と比較して 2 倍の精度で溶解前のコーヒー粒子径を測定可能となることが判った。

【0089】

さらに、本実施例と同様な可視光・近赤外分光分析方法により、溶解前の砂糖や塩の粒子の大きさを測定することも可能である。

【実施例 5】

【0090】

実施例 5 は、試料検体中の異なるバクテリアを判別した例であって、牛乳中のバクテリア Staphylococcus (msta) と、Streptococcus (mstr) をそれぞれ段階的に希釈して、 $10^{-1} \sim 10^{16}$ (colony/ml) 濃度としたサンプルを光路長 1 mm の石英セルに注入し、400 nm ~ 2500 nm の波長範囲の光を 3 回繰り返し照射して分光分析を行ったものである。

【0091】

得られたスペクトルデータから、主成分分析 (PCA) と SIMCA 解析を行った。

【0092】

解析結果を図 15 に示す。図 15 は第 1 主成分 (Factor1) と第 2 主成分 (Factor2) と第 3 主成分 (Factor3) での msta と mstr との判別結果を表しており、バクテリア msta 群とバクテリア mstr 群とが確実に判別されることを示している。

【0093】

上記したように、複数回 (3 回) 連続繰り返し照射による摂動 (perturbation) を与えながらの分光分析により、バクテリア msta 群とバクテリア mstr 群とが確実に判別可能となることが判った。つまり、従来の培養法によれば 48 時間程度のバクテリア培養時間が必要であったものが、本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法によれば、培養する必要もなく異なるバクテリアをリアルタイムに判別することができるという効果が得られる。

【実施例 6】

【0094】

実施例 6 は、牛等の哺乳動物の血漿や胃液や生乳の成分濃度を測定した例であって、牛の生体液を用いて、光路長 1 mm の石英セルに注入した試料検体に 400 nm ~ 2500 nm の波長範囲の光により分光分析を行ったものである。測定は一日に 2 回 (朝、夕各 1

回)の分光分析を三日連続して行った。さらに、その後3週間違う餌を与えた後で、同様に一日に2回(朝、夕各1回)の分光分析を三日連続で行い、その効果を確認したものである。

【0095】

上記の測定回数を朝夕各1回で三日連続としたが、一日に2回以上測定してもよく、また継続日数も三日以上としてもよいと思われる。このように測定間隔と測定回数を変化させて得られたスペクトルデータの前処理を行い、PLS法とクロスバリデーション解析を行った。

【0096】

解析結果を図16と図17に示す。図16(a)(b)は牛の血漿(Blood Plasma)のスペクトルを計測することで、その牛の牛乳の成分濃度(Fat脂肪、Crude Protein粗蛋白質、Caseinカゼイン、True protein蛋白質、MUN乳中尿素態窒素、Lactose乳糖)を予測した結果であって、図16(c)(d)は牛の牛乳のスペクトルを計測することで、その牛の血漿の成分濃度(Albuminアルブミン、Glucoseグルコース、BUN血中尿素態窒素)を予測した結果である。

【0097】

また、図17(a)(b)は牛の胃液のスペクトルを計測することで、その牛の牛乳の成分濃度(Fat脂肪、Crude Protein粗蛋白質、Caseinカゼイン、True protein蛋白質、MUN乳中尿素態窒素、Lactose乳糖)を予測した結果であって、図17(c)(d)は牛の牛乳のスペクトルを計測することで、その牛の胃液の成分濃度(PHペーハー、NH₃-Nアンモニア態窒素、C2脂肪酸、C3脂肪酸、C4脂肪酸)を予測した結果を示している。

【0098】

図16(b)から判るように、本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法により、牛の血漿のスペクトルを計測して高い相関にて生乳の成分濃度が予測可能となった。特にカゼインではその相関係数 $R=0.938$ であり、この時の統計的有意 $p<0.001$ であって、1000回に1回以下の予測誤差となる。また、図17(b)に示す牛の胃液のスペクトルを計測することで、生乳中に含有されるカゼイン濃度を $R=0.902$ 、 $p<0.001$ にて予測できることが判る。

【0099】

このように、測定間隔と測定回数を変化させるという摂動(perturbation)を与えながら分光分析を行うことで、牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液から、前記牛等の哺乳動物の生乳に含有される成分濃度を予測し測定することができる。また、前記生乳から、前記牛等の哺乳動物の血漿や胃液等の生体液の成分濃度を測定することが可能となるので、乳牛等の生態情報を容易に得ることができる。

【実施例7】

【0100】

実施例7は、牛乳の複数の成分濃度を測定した例であって、光路長を変更して複数回の測定を行うという摂動を与えながら、石英セルに注入した試料検体に対して700nm～1100nmの第一の波長範囲と、1100nm～2400nmの第二の波長範囲の分光分析を行ったものである。

【0101】

近赤外光であっても短波長域、具体的には700nm～1100nmの領域の近赤外光であれば、長波長域よりも10～100倍ほど透過力が大きく、短波長域の近赤外光を用いれば光路長を1～2cm程度にすることができる。さらに、特殊な石英セルに替えて試験管等の安価な容器を使用することもできる。

【0102】

そのために、光路長がそれぞれ1mm、4mm、10mmの石英セル／又は試験管に注入した試料検体を用いて、700nm～1100nmの短波長領域の分光分析を行うことができる。

【0103】

また、図18(a)に示す幅1mmの矩形試料検体注入部3Aを備える石英セル3に試料検体を注入した後で、図18(b)に示す方向4, 5に所定の光を照射することで、任意の光路長に設定することができる。この方法により同一試料検体の光路長を1mm、4mm、10mmと変化させて測定したところ、光路長が長くなる程ノイズが減り、高精度となることが判った。

【0104】

得られたスペクトルをPLS法とクロスバリデーションにより解析し得られたSECV(クロスバリデーション誤差)を図19(a)(b)(c)に示す。

【0105】

図19(a)にはFAT(牛乳中の脂肪濃度)を測定した時のSECVであり、図19(b)にはPROTEIN(牛乳中の蛋白質濃度)を測定した際のSECVであり、図19(c)にはLACTOSE(牛乳中の乳糖濃度)を測定した際のSECVを示している。

【0106】

図19(a)に示す脂肪分の測定結果から、光路長1mmでは波長領域700~1100nmのSECVが0.45であるが、光路長4mmおよび10mmで波長領域700~1100nmでのSECVは0.2となるので、光路長を長くすることで短波長領域700~1100nmにおいても十分精度よく測定可能であることが確認される。

【0107】

また図19(c)に示す乳糖の測定結果からは、短波長領域700~1100nmと長波長領域1100~2400nmでのSECVが共に0.09であり、高精度の測定が短波長領域700~1100nmで測定可能であることを示している。

【0108】

上記したように短波長領域にて長い光路長にて、試料検体を測定可能となるので、ノイズの少ない、誤差の小さい判定を行うことができると共に、特殊な石英セルではなく、通常の試験管等により測定することもできる。

【0109】

また、光路長を変化させて多数のデータを測定することでさらに精度のよいモデルが得られることは明らかである。

【実施例8】

【0110】

実施例8は牛乳中の脂肪濃度を測定した例であって、試料検体を光路長1mmの石英セルに注入し、摂動(perturbation)として10Vの電圧を付加しながら、500~1000nmの波長範囲の光を3回繰り返し照射して分光分析を行ったものである。

【0111】

電圧付加手段として牛乳の電気伝導度を測定するための装置であるMilk Checker(オリエンタルインスツルメント社製)を使用し、10Vの電圧を付加しながら、クボタ社製の分光分析器を用いて500nm~1000nmの波長範囲の光を3回連続繰り返し照射して分光分析を行った。また、分光分析器としてその他の分光分析器(例えば、ニレコ社製近赤外分光器NIRSystem6500)を用いてもよく、特に限定するものではない。

【0112】

その時に得られたスペクトルをPLS法とクロスバリデーションにより解析した例を図20に示す。図20(a)は解析された回帰ベクトルを示しており、図20(b)には解析結果を示している。

【0113】

図20(b)から、電圧を付加しない場合(Without EMF)にはFactor10のバリデーション相関(rVal)が0.98であり、その時のバリデーション誤差(SEV)が0.204269であることを示している。

【0114】

また、電圧を付加した後(After Applying EMF)では、Factor9でそれぞれrVal=0.

9 9 6 2 5 6 で $SEV = 0.087212$ である。さらに、電圧を付加しながら (In the presence of EMF) の測定では、Factor9 で $rVal = 0.997483$ で $SEV = 0.071528$ となっている。

【0115】

つまり、摂動 (perturbation) として 10 V の電圧を付加しながら分光分析すれば、バリデーション誤差が $1/3$ となるので、測定の精度が 3 倍となるモデルが得られたことが判る。

【実施例 9】

【0116】

実施例 9 はクリーム状あるいは乳化状の製品の成分を測定する例としてマヨネーズの成分を測定した実施例であって、携帯型近赤外分光器 Fruit Tester 20 (Fantec 社製) を使用して、600 nm ~ 1100 nm の波長範囲の光を 3 回連続繰り返し照射すると共に、それぞれの照射時間を変化させて分光分析を行い、前記成分の濃度や粒子径等の成分の特性を測定したものである。

【0117】

前記照射時間の変化として、20、21、22 ms の 3 種類とし、さらにこの組合わせで複数回の繰り返し照射を行い、合計 180 サンプルの測定を行った。

【0118】

前処理としてスムージング処理と一次微分、二次微分を行い PLS による回帰モデルを作成し、クロスバリデーションにより検証を行った。その際のクロスバリデーション解析の結果としての各要素の相関係数と SEV (バリデーション誤差) の一覧表を図 21 に示す。

【0119】

ここに示す situation とはサンプルおよび前処理の条件であって、1&3.sm とは連続測定 1 回目と 3 回目のデータをスムージング処理して多変量解析したことを示している。また、1&3.sm-1 とはさらに一次微分を行っていることを示している。さらに、f は PLS 回帰分析のファクター数を示している。

【0120】

また、viscosity は粘度であり、temparatu とは温度を示し、acid は酸成分を、salt は塩分を、moisyure は水分を、oil は油分を示している。

【0121】

Viscosity (粘度) の SEV の数値が 6675 等と大きな数字となっているが、これは粘度の測定をミキサーを回転させ、その時の回転数で測定したためである。

【0122】

種々の条件による測定の結果、図中の * 印に示す 1&2&3.sm、つまり 20、21、22 ms の連続照射を 1 回目と 2 回目と 3 回目と繰り返し照射したデータをスムージング処理したものが、高い相関係数であると共に SEV が小さいという最良の結果を示している。

【0123】

また、20 ms で 3 回連続照射した後で、21 ms で 3 回連続照射し、さらに、22 ms で 3 回連続照射しても同様な結果が得られる。

【0124】

このようにクリーム状あるいは乳化状の製品であるマヨネーズの成分を測定する際に、摂動 (perturbation) として 3 回連続照射しながら分光分析を行うと共に、PLS とクロスバリデーションによりモデルの作成と検証を行い、精度のよい結果を得ることができる。

【0125】

さらに、成分の判別だけでなく本実施例に係る可視光・近赤外分光分析方法により、各成分の粒子径 (大きさ) を測定することも可能である。

【0126】

上記の実施例 1 から実施例 9 で説明したように、400 nm ~ 2500 nm の波長範囲

の光を利用して各試料中の成分の特性を測定する分光分析方法において、試料検体に所定の条件を付加することで摂動を与えながら分光分析を行い、前記試料検体の各成分に応じたシフトする所定の水分子の応答スペクトルを計測して多変量解析を行うことにより、従来の方法では判別困難なものを判別可能とし、成分特性の高精度な測定を可能とし、さらに超低濃度成分の検出や成分の判別及び／又は成分の特性をリアルタイムに測定可能とする可視光・近赤外分光分析方法を得ることができる。

【0127】

またPLSとクロスバリデーション法によりモデルの作成と検証を行うことで、精度のよい結果が得られて、超低濃度の成分でも検出可能となった。さらにはSIMCA法を使用することでそれぞれの成分が明らかにクラス分類されていることが判った。

【図面の簡単な説明】

【0128】

【図1】本発明に係る可視光・近赤外分光分析方法の流れを示すブロック図である。

【図2】水分子の吸収バンドの強度変化を示す概略説明図である。

【図3】試料検体中のバクテリアを測定した際の吸収スペクトルを示す。

【図4】CNSの回帰ベクトルを示す。

【図5】CPSの回帰ベクトルを示す。

【図6】CNSの検量線を示す。

【図7】CPSの検量線を示す。

【図8】クロスバリデーション解析後の検量結果を示す。

【図9】第1主成分(Factor1)、第3主成分(Factor3)、第5主成分(Factor5)に基づくCNSとCPSの3次元プロットである。

【図10】(a)にはCNSとCPSのクラス間距離を求めたSIMCA解析の結果を示し、(b)にはSIMCAを使った判別結果を示している。

【図11】(a)は第1主成分(Factor1)と第3主成分(Factor3)とによるPrPとPrP(Cu)とPrP(Mn)の判別結果を示しており、(b)は第3主成分(Factor3)と第5主成分(Factor5)とによる判別結果を示し、(c)はそれぞれの主成分のローディングを示している。

【図12】SIMCA解析によるPrPとPrP(Cu)とPrP(Mn)の各クラス間の距離を示す。

【図13】(a)は試料検体中の抗体濃度を測定した際の検量線を示し、(b)にはクロスバリデーションによる解析結果を示す。

【図14】(a)は溶解前のコーヒー粒子径を測定した際の検量線を示し、(b)にはクロスバリデーションによる解析結果を示す。

【図15】試料検体中のバクテリアを測定した際の第1主成分(Factor1)と第2主成分(Factor2)と第3主成分(Factor3)とによるmstaとmstrの判別結果を表している。

【図16】(a)(b)は牛の血漿スペクトルから、その牛の牛乳の成分濃度を予測した結果を示し、(c)(d)は牛の牛乳のスペクトルから、その牛の血漿の成分濃度を予測した結果を示している。

【図17】(a)(b)は牛の胃液のスペクトルから、その牛の牛乳の成分濃度を予測した結果を示し、(c)(d)は牛の牛乳のスペクトルから、その牛の胃液の成分濃度を予測した結果を示している。

【図18】石英セルを示しており、(a)は全体斜視図であり、(b)は平面図である。

【図19】牛乳の複数の成分濃度を測定した際のSECVを示し、(a)にはFAT(脂肪分)のSECVであり、(b)はPROTEIN(蛋白質)のSECVであり、(c)はLACTOSEのSECVを示している。

【図20】(a)は牛乳中の脂肪濃度を測定した際の回帰ベクトルY1を示し、(b)にはクロスバリデーションによる解析結果を示す。

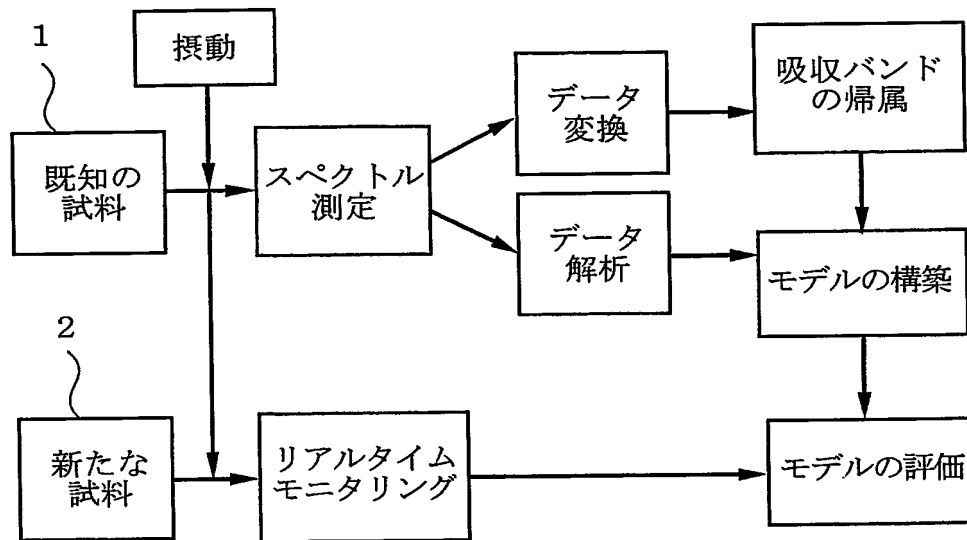
【図 21】 マヨネーズ成分を測定した際の各要素の相関係数と S E V（バリデーション誤差）の一覧表を示す。

【符号の説明】

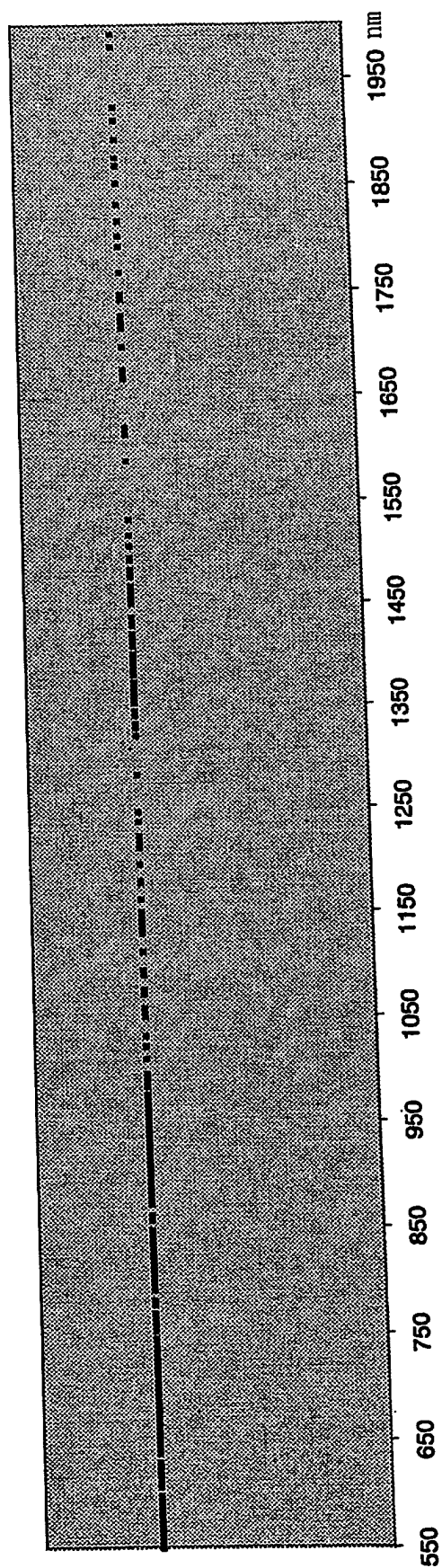
【0129】

- 1 既知の試料
- 2 新たな試料
- 3 石英セル
- 3 A 試料検体注入部
- 4 照射方向
- 5 照射方向
- L 1 境界

【書類名】図面
【図1】

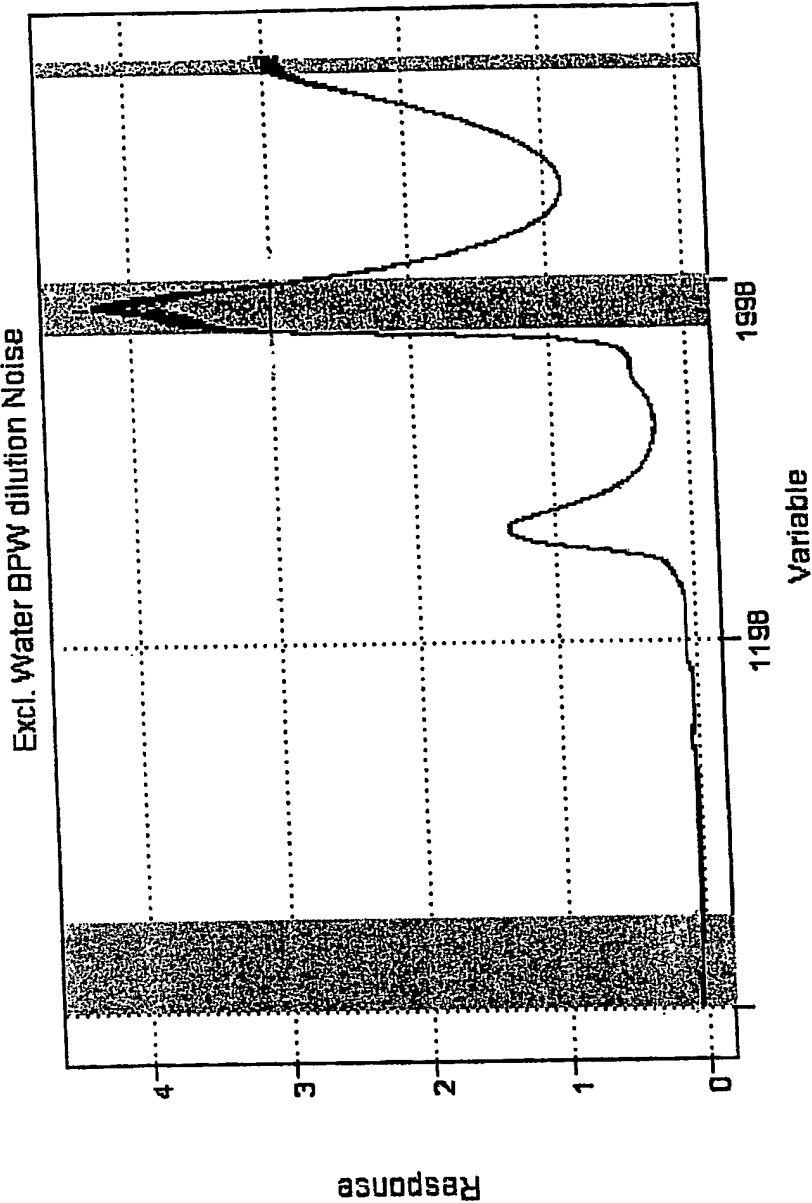


【図 2】

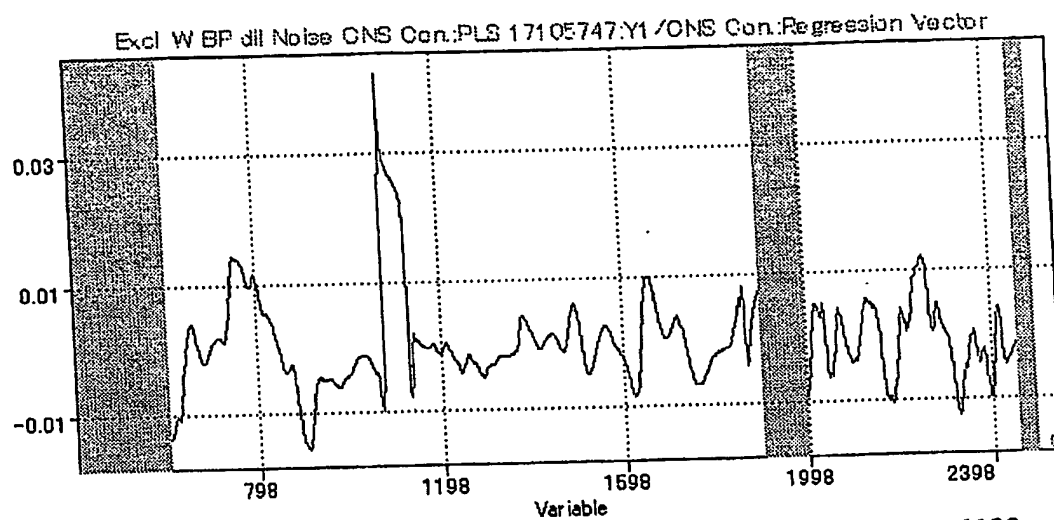


【図 3】

測定結果
生スペクトルとノイズ領域

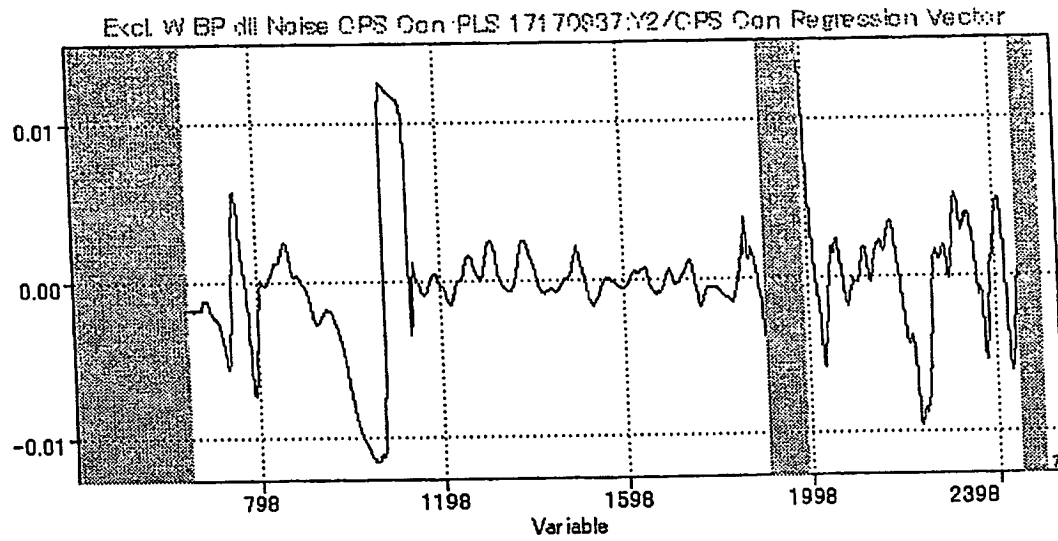


【図 4】



CNS bacteria Regression Vector. Important wavelengths: 1406-1500nm, 1180nm-1306nm

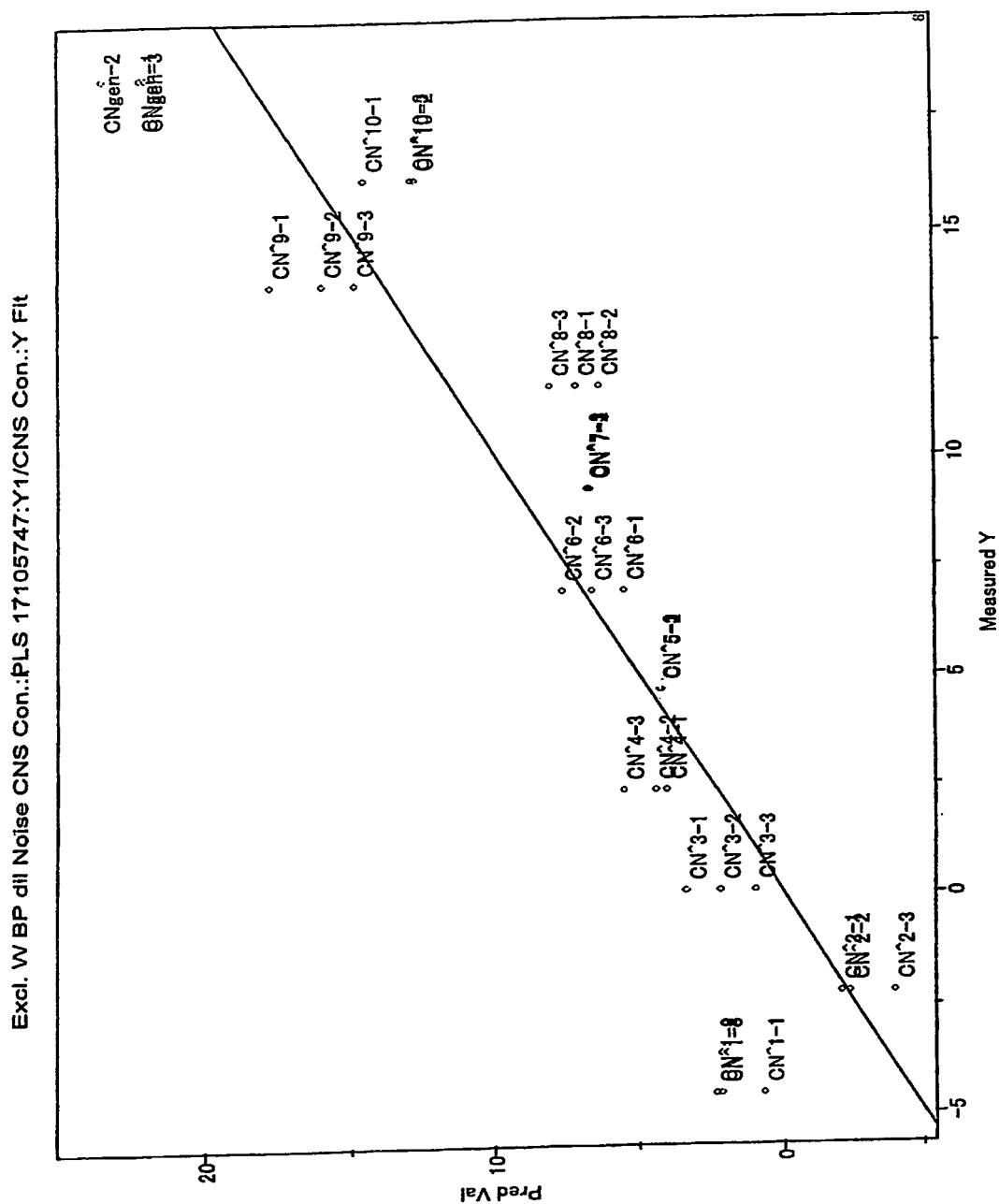
【図 5】



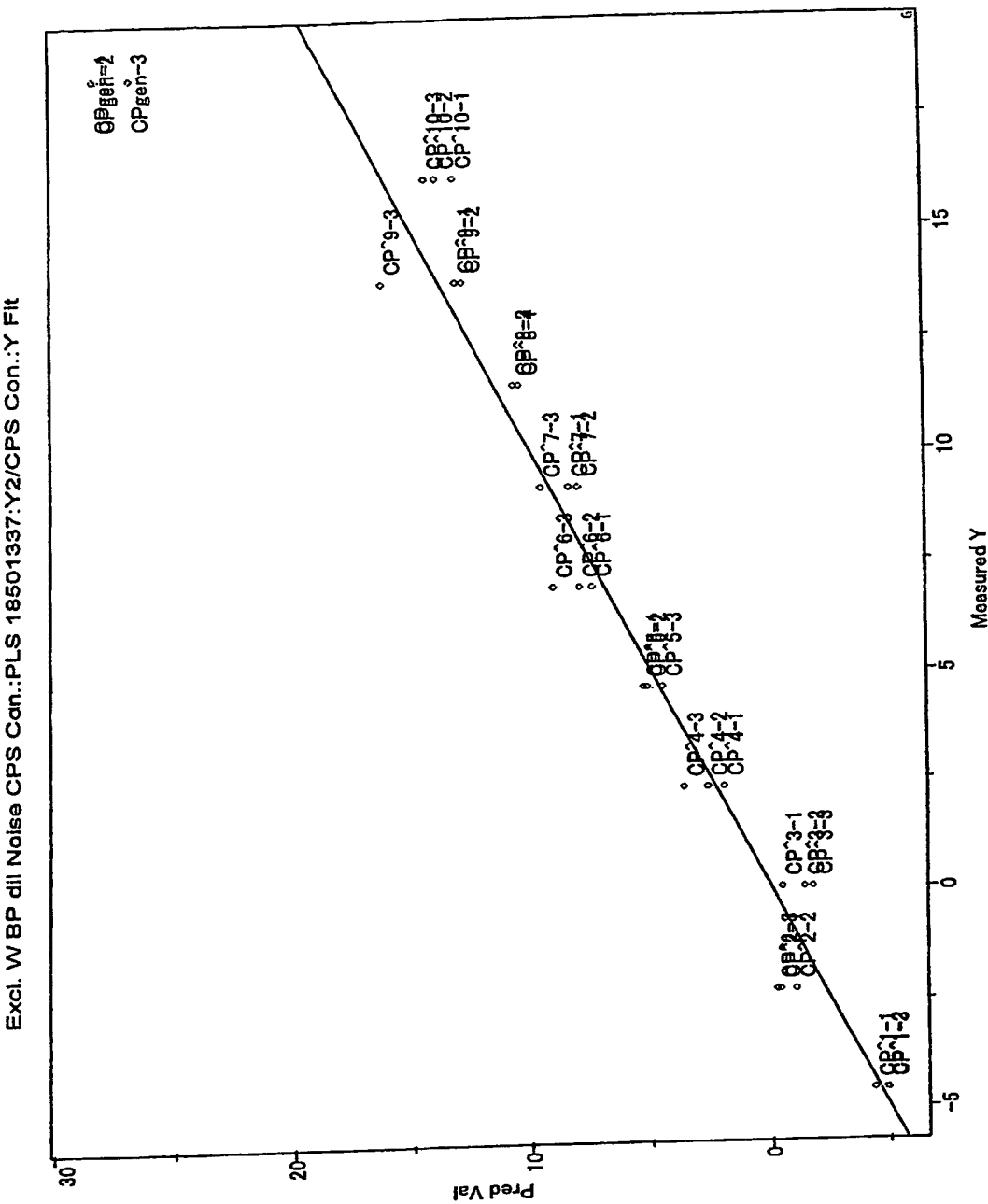
CPS Regression vector.

Important wavelengths: 740nm, 770nm, 808nm, 1156-1198nm, 1466nm, 1476nm, 1650nm, 1686nm, 1704nm, 1720nm, 1750nm, 1846nm, 1890nm

【図 6】



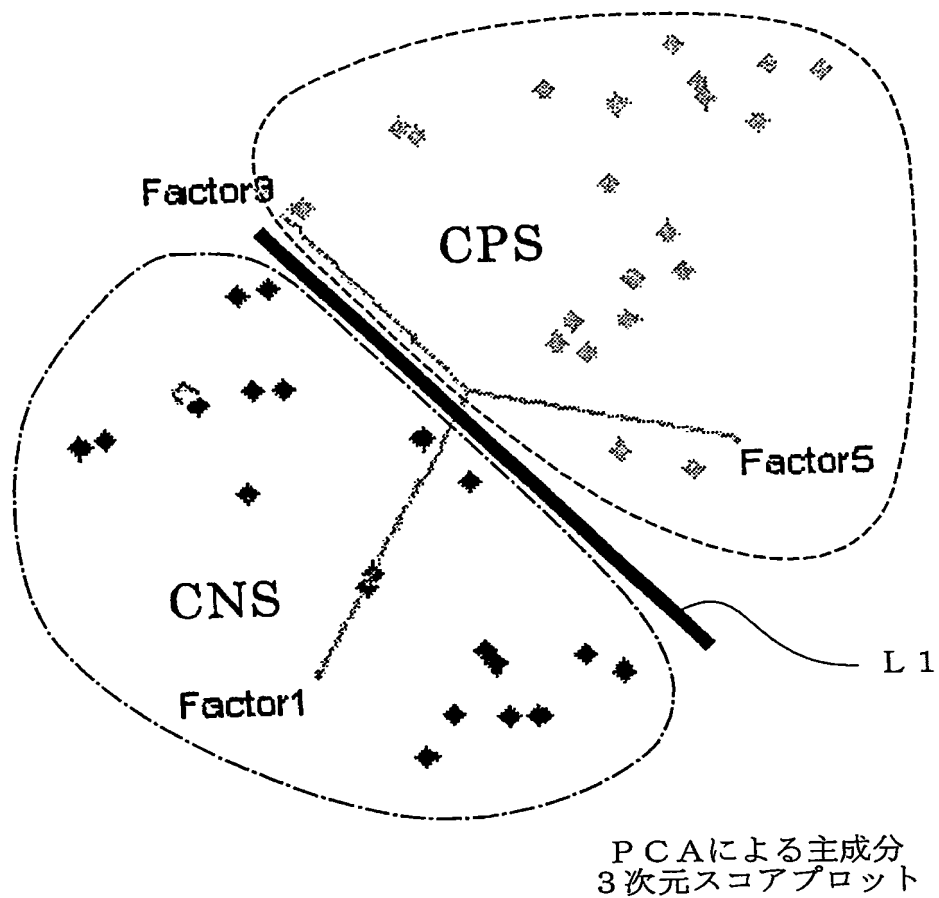
【図 7】



【図 8】

CPS								
Factor6	Percent	cumulative	SEV	Press Val	r Val	SEC	Press Cal	r Cal
	0.952331	97.56091	3.096218	316.3566	0.944926	0.674208	11.81845	0.996617
CNS								
Factor 9	Percent	cumulative	SEV	Press Val	r Val	SEC	Press Cal	r Cal
	0.000002	99.99999	3.04932	306.8456	0.909211	0.638169	9.774219	0.997202

【図9】



【図 10】

(a)

SIMCA解析結果

CNSとCPSのクラス間距離

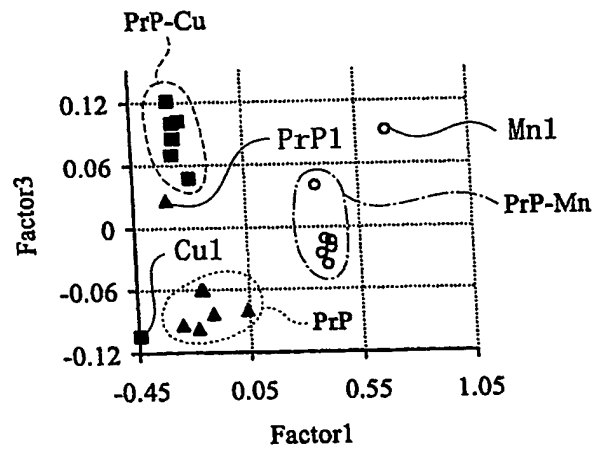
	サンプル・波長選択	距離
A 1	水除外 (Autoscale,Smooth(15),2nd Derivative(25))	0.836
A 2	水、ノイズ除外 (Autoscale,Smooth(15),1st Derivative(25))	0.823
A 3	水、ノイズ除外 (Autoscale,Smooth(15),2nd Derivative(25))	0.984
A 4	水、BPW、ノイズ除外 (Autoscale,Smooth(15),1nd Derivative(25))	1.156
A 5	水、BPW、ノイズ除外 (Autoscale,Smooth(15),2st Derivative(25))	1.826
A 6	水、BPW、希釈サンプル、ノイズ除外 3回 (Autoscale,Smooth(15),1st Derivative(25))	4.254
A 7	水、BPW、希釈サンプル、ノイズ除外 (Autoscale,Smooth(15),2nd Derivative(25))	2.103
A 8	水、BPW、希釈サンプル、ノイズ除外 1回 (Autoscale,Smooth(15),1st Derivative(25))	4.132

(b)

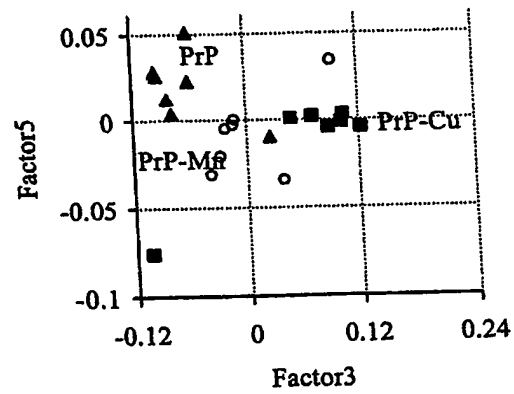
	Pred. CNS	Pred.CPS	No match
CNS	34.0000	0.0000	0.0000
CPS	0.0000	36.0000	0.0000

【図11】

(a)



(b)



(c)

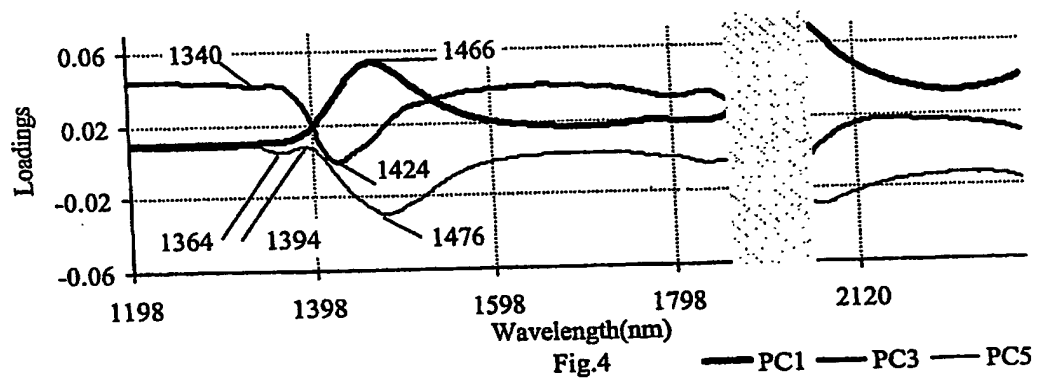


Fig.4

— PC1 — PC3 — PC5

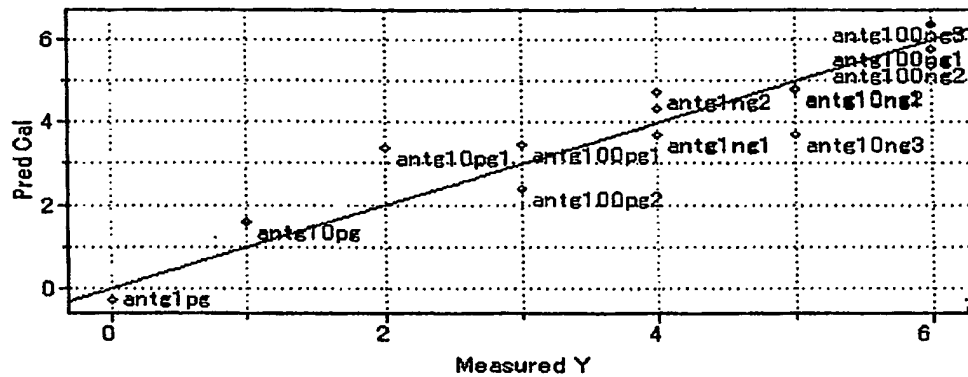
【図 12】

Table 2 SIMCA Interclass Distance

	PrP-Cu	PrP-Mn	PrP
PrP-Cu	0.00	28.81	4.15
PrP-Mn	28.81	0.00	11.44
PrP	4.16	11.44	0.00

【図 13】

(a)

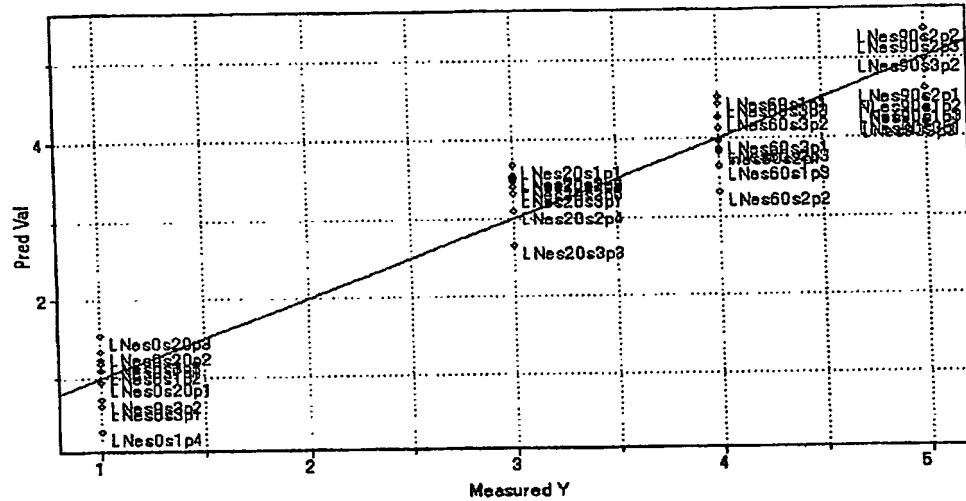


(b)

Factor9 (3回)	Percent	cumulative	SEV	Press Val	r Val	SEC	Press Cal	r Cal
	0.009203	99.94567	1.008785	14.24707	0.866991	0.026814	0.002876	0.999969
Factor5 (1回)	Percent	cumulative	SEV	Press Val	r Val	SEC	Press Cal	r Cal
	1.745422	99.94188	3.558607	88.64576	0.85991	0.41932	0.17583	0.99679

【図 14】

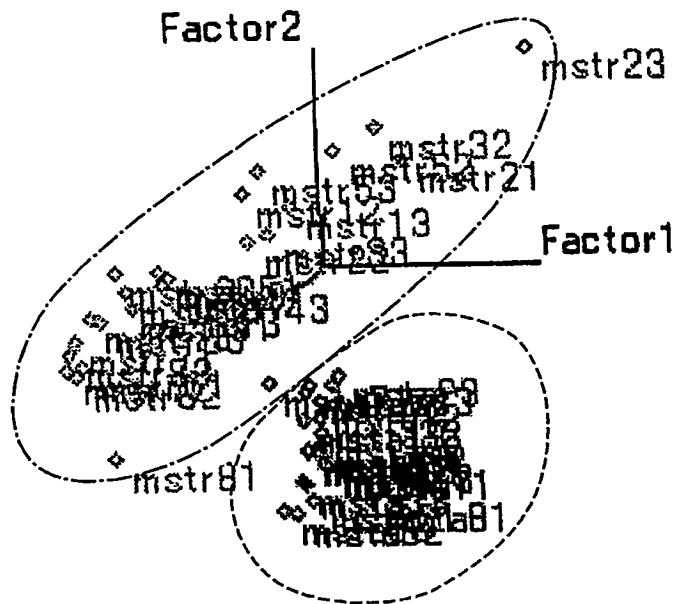
(a)



(b)

Factor6 (3回)	Percent 0.116864	cumulative 99.8904	SEV 0.466675	Press Val 8.058082	r Val 0.951239	SEC 0.379212	Press Cal 4.314054	r Cal 0.973881
Factor5 (1回)	Percent 6.582126	cumulative 98.31849	SEV 0.937039	Press Val 3.512166	r Val 0.893979	SEC 0.357026	Press Cal 0.127468	r Cal 0.992689

【図15】



【図 16】

Blood Plasma Spectra – Milk Component Estimation

Table 3-1. Relationship between first 10 principal components of blood plasma spectra and milk components

Parameter	min	max	average	The best way of data transf.	R
Fat, %	2.00	5.47	3.41	Log(1/T)	0.698
Crude Protein, %	2.88	4.05	3.32	D1	0.685
Casein, %	2.18	2.87	2.62	D1	0.728*
True protein, %	2.74	3.87	3.17	D1	0.683
MUN, %	1.40	3.10	2.00	Log(1/T)	0.546
Lactose, %	4.12	4.93	4.54	Log(1/T)	0.534

Statistically significant at: * P<0.05

Table 3-2. NIRS calibration and validation results for estimation of milk composition from the spectra of blood plasma by PLS regression

Parameter	The best way of data transf.	PLS factors	SEC	R	SECV
Fat, %	Log(1/T)	2	0.612	0.575	0.692
Crude protein, %	D1	4	0.208	0.829***	0.377
Casein, %	D1	6	0.108	0.938***	0.273
True protein, %	D1	4	0.133	0.863***	0.281
MUN, %	Log(1/T)	5	0.248	0.938***	0.584
Lactose, %	D1	3	0.177	0.596	0.239

Statistically significant at: *** P<0.001

Milk Spectra – Blood Plasma Component Estimation

Table 3-3. Relationship between first 10 principal components of milk spectra and some components of blood plasma

Parameter	min	max	average	The best way of Data transf.	R
Albumin, %	2.87	3.58	3.25	Log(1/T)	0.624
Glucose, mg/dl	45.9	72.7	61.6	Log(1/T)	0.361
BUN, %	11.3	21.2	15.9	Log(1/T)	0.618

Table 3-4. NIRS calibration and validation results for estimation of blood plasma composition from the spectra of milk by PLS regression

Parameter	The best way of data transf.	PLS factors	SEC	R	SECV
Albumin, %	Log(1/T)	7	0.174	0.718**	0.202
Glucose, mg/dl	Log(1/T)	4	4.588	0.322	4.691
BUN, %	D1	8	1.771	0.682*	1.969

Statistically significant at: * P<0.05 ** P<0.01

【図 17】

Rumen Juice Spectra – Milk Component Estimation

Table 4-1. Relationship between first 10 principal components of rumen juice spectra and milk components

Parameter	min	max	average	The best way of Data transf.	R
Fat, %	2.00	5.47	3.41	D1	0.750*
Crude Protein, %	2.88	4.05	3.32	D2	0.703
Casein, %	2.18	2.87	2.62	D2	0.826**
True protein, %	2.74	3.87	3.17	D2	0.698
MUN, %	1.40	3.10	2.00	Log(1/T)	0.665
Lactose, %	4.12	4.93	4.54	D1	0.593

Statistically significant at: * P<0.05 ** P<0.01

Table 4-2. NIRS calibration and validation results for estimation of milk composition from the spectra of rumen juice by PLS regression

Parameter	The best way of data transf.	PLS factors	SEC	R	SECV
Fat, %	Log(1/T)	5	0.455	0.766***	0.583
Crude protein, %	D2	4	0.138	0.890***	0.231
Casein, %	D2	5	0.091	0.902***	0.191
True protein, %	D2	4	0.139	0.826***	0.241
MUN, %	Log(1/T)	7	0.161	0.942***	0.393
Lactose, %	Log(1/T)	3	0.204	0.283	0.232

Statistically significant at: *** P<0.001

Milk Spectra – Rumen Juice Component Estimation

Table 4-3. Relationship between first 10 principal components of milk spectra and some components of rumen juice

Parameter	min	max	average	The best way of Data transf.	R
PH	5.4	6.5	6.27	Log(1/T)	0.515
NH ₃ -N	2.2	18.8	8.42	Log(1/T)	0.516
C ₂	50.4	64.6	58.6	Log(1/T)	0.555
C ₃	16.9	36.1	23.1	Log(1/T)	0.532
C ₄	11.1	19.0	14.7	Log(1/T)	0.457

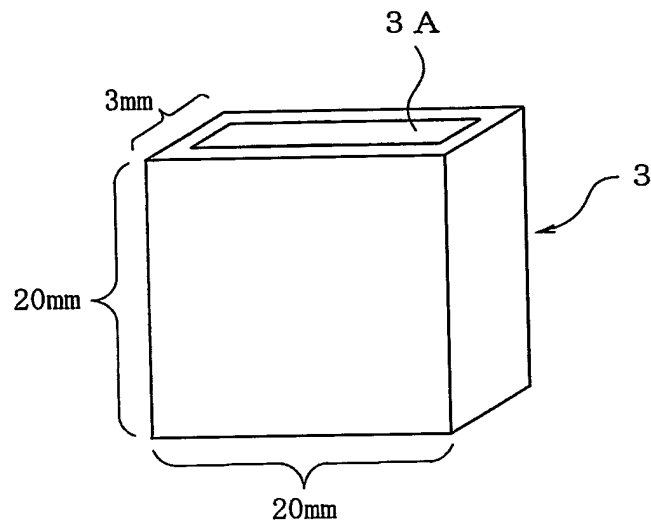
Table 4-4. NIRS calibration and validation results for estimation of rumen juice composition from the spectra of milk by PLS regression

Parameter	The best way of data transf.	PLS factors	SEC	R	SECV
PH	Log(1/T)	4	0.26	0.471	0.27
NH ₃ -N	Log(1/T)	7	3.70	0.649*	4.22
C ₂	Log(1/T)	7	3.02	0.692**	3.56
C ₃	Log(1/D)	7	3.48	0.686*	4.06
C ₄	Log(1/T)	6	1.71	0.569	1.89

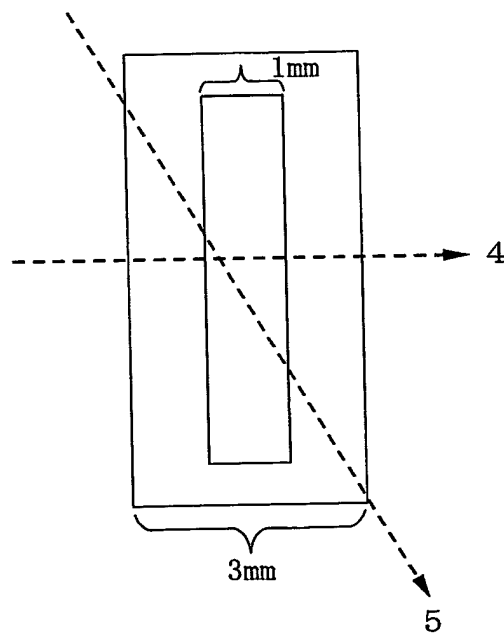
Statistically significant at: * P<0.05 ** P<0.01

【図 18】

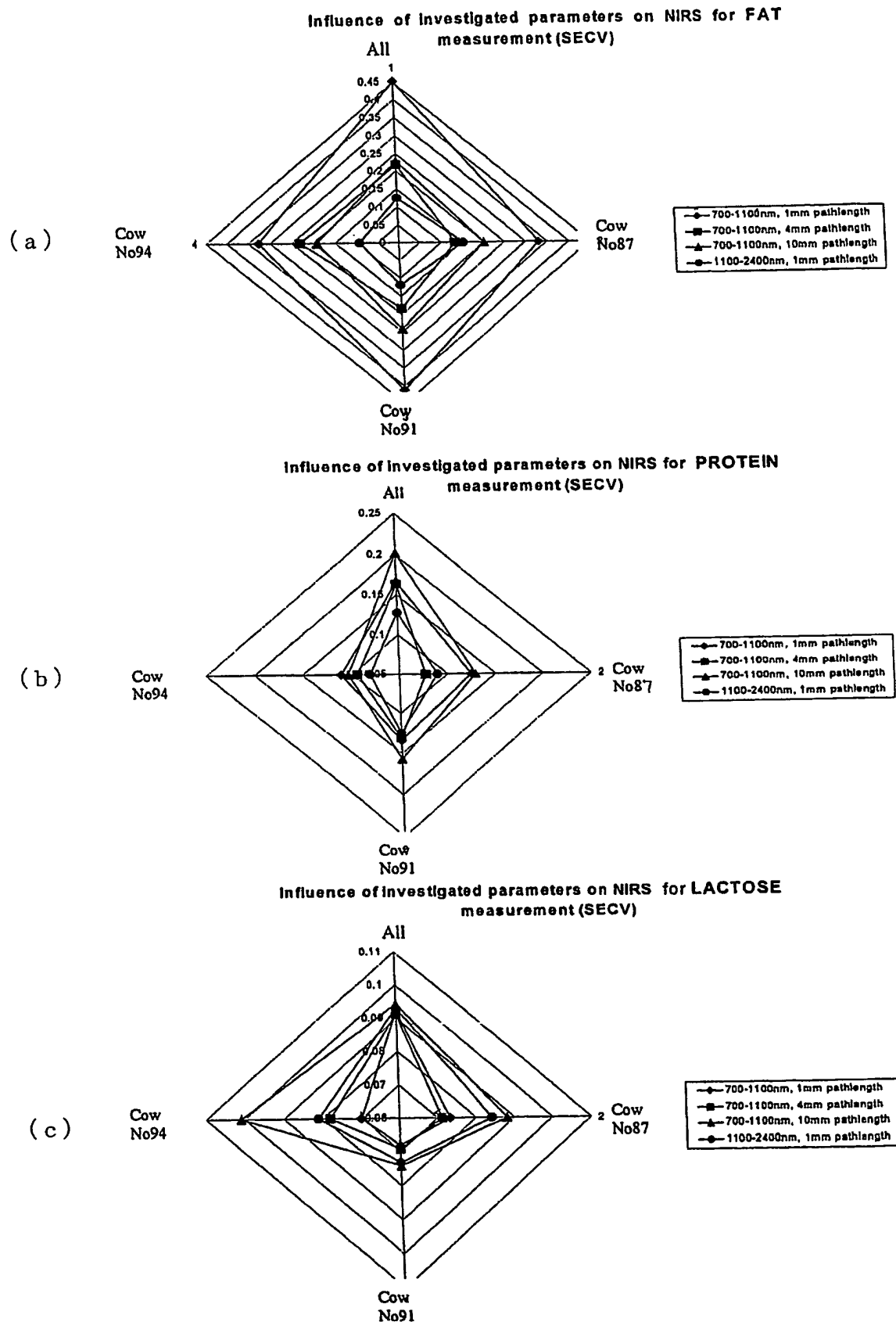
(a)



(b)

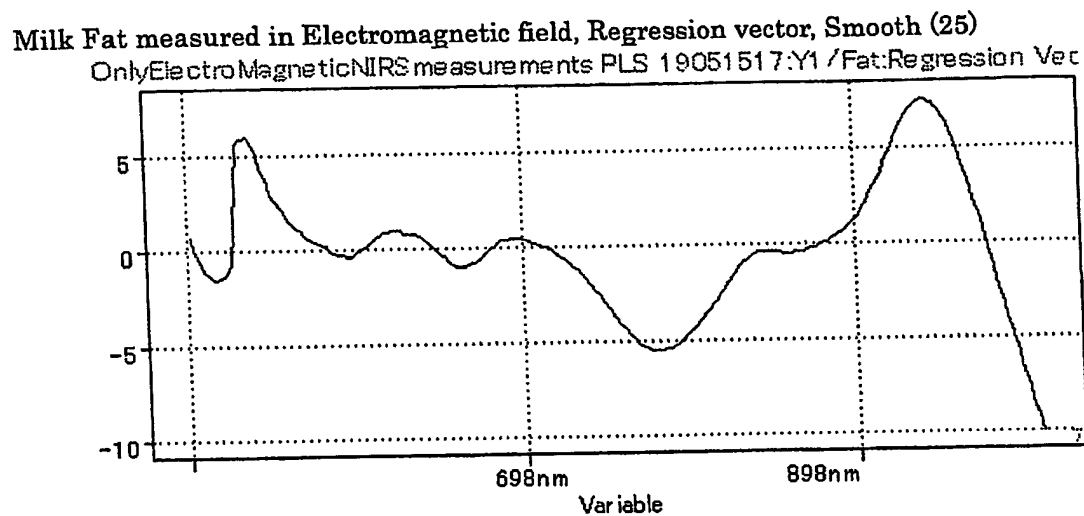


【図 19】



【図 20】

(a)



Wavelengths: 534nm, 620nm, 688nm, 694nm, 778nm, 844nm, 858nm, 858nm, 940nm

(b)

	Factors	SEV	r Val	SEC	r Cal
Without EMF After Applying EMF In the presence of EMF	Factor10	0.204269	0.980037	0.136665	0.994630
	Factor9	0.087212	0.996256	0.067217	0.998611
	Factor9	0.071528	0.997483	0.056339	0.999024

【図21】

相関係数一覧表

situation	viscosity	f	SEV	temparatu	f	SEV	acid	f	SEV	salt	f	SEV	moisture	f	SEV	oil	f	SEV
1&3.sm	0.8805	8	6675	0.8497	8	0.8974	0.8591	6	0.0091	0.9268	8	0.0211	0.9477	8	0.2042	0.927	7	0.3159
1&3.sm-1	0.8751	7	6815	0.8344	7	0.9387	0.8563	5	0.0092	0.9245	11	0.0213	0.9454	10	0.2087	0.9203	7	0.3296
1&3.sm-2	0.8441	14	7585	0.7742	10	1.0823	8429	9	0.0096	0.9171	8	0.0224	0.946	8	0.2075	0.9174	8	0.3356
3.sm	0.8736	7	6855	0.8488	8	0.9021	0.851	6	0.0094	0.9277	7	0.0218	0.9439	8	0.2117	0.9194	6	0.3339
3.sm-1	0.8614	6	7163	0.8241	7	0.9688	0.8449	4	0.0096	0.9195	6	0.0221	0.9397	4	0.2189	0.9109	4	0.3476
3.sm-2	0.7933	2	8568	0.7321	6	0.1689	0.8181	7	0.0103	0.9108	8	0.0233	0.9409	10	0.2171	0.906	8	0.3574
1&2.sm	0.8913	9	6386	0.8446	8	0.9115	0.8589	7	0.0091	0.919	6	0.0222	0.9479	7	0.2039	0.929	7	0.3116
1&2.sm-1	0.8866	7	6513	0.8342	7	0.9391	0.8332	6	0.0091	0.9228	7	0.0217	0.9468	10	0.2061	0.9228	7	0.3247
1&2.sm-2	0.8591	15	7236	0.7977	15	1.0328	0.8455	8	0.0096	0.9149	9	0.0227	0.9462	9	0.2072	0.9201	8	0.3302
2.sm	0.8882	8	6484	0.836	8	0.9365	0.8468	6	0.0095	0.9182	7	0.0223	0.9428	7	0.2135	0.9227	7	0.3251
2.sm-1	0.8834	10	6629	0.8246	7	0.9661	0.8468	5	0.0095	0.915	7	0.0227	0.9395	10	0.2197	0.9177	5	0.3349
2.sm-2	0.8314	13	7950	0.7689	13	1.1107	0.8332	3	0.0099	0.9064	3	0.0238	0.9351	9	0.2274	0.9124	3	0.345
2&3.sm	0.8904	8	6408	0.8559	8	0.8803	0.857	6	0.0092	0.9266	7	0.0212	0.9457	9	0.2023	0.9272	7	0.3154
2&3.sm-1	0.886	9	6533	0.8414	7	0.9203	0.8542	7	0.0093	0.9267	11	0.0212	0.9468	10	0.2061	0.9251	11	0.3251
2&3.sm-2	0.8608	15	7198	0.8097	15	1.0051	0.8438	9	0.0096	0.9177	12	0.0224	0.9458	9	0.208	0.9186	4	0.333
1.sm	0.8751	7	6817	0.8312	7	0.9473	0.855	6	0.0093	0.9194	7	0.0221	0.9448	7	0.2097	0.9238	7	0.3227
1.sm-1	0.8638	6	7107	0.8138	7	0.9935	0.8536	4	0.0093	0.9162	6	0.0226	0.9404	4	0.2177	0.9133	7	0.3438
1.sm-2	0.7962	15	8725	0.7472	10	1.155	0.8456	2	0.0095	0.9061	2	0.0238	0.9402	2	0.2179	0.9095	2	0.35
1&2&3.sm	0.8908	9	6397	0.8535	8	0.8868	0.8614	7	0.0091	0.9281	7	0.0203	0.9496	9	0.2007	0.9295	7	0.3105
1&2&3.sm	0.8866	9	6513	0.8408	7	0.9213	0.8607	7	0.0091	0.9272	11	0.0211	0.9484	11	0.203	0.9265	11	0.317
1&2&3.sm	0.865	15	7077	0.8049	15	1.0129	0.8538	8	0.0093	0.9203	9	0.022	0.9488	9	0.2022	0.9233	9	0.3235

*

1 連続測定1回目のデータ
 2 連続測定2回目のデータ
 3 連続測定3回目のデータ

Pretreatment: Autoscale
 sm smoothing
 -1 1st derivative
 -2 2nd derivative

【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 4 0 0 n m ~ 2 5 0 0 n m の波長範囲の可視光及び／又は近赤外線を利用して各試料中の成分の判別や成分の特性を測定する分光分析方法において、従来の方法では判別困難なものを判別可能とし、成分特性の高精度な測定を可能とし、また超低濃度成分の検出を可能とし、さらに成分の特性をリアルタイムに測定可能とする可視光・近赤外分光分析方法を提供することである。

【解決手段】 分光分析方法において、試料検体に所定の条件を付加し摂動を与えながら前記試料検体のスペクトル測定を行い、前記スペクトルから（可視光・近赤外）吸収スペクトルを求めると共に、P L S 法及び／又はクロスバリデーション法を用いて成分の特性を数値化する定量的解析もしくはP C A 法及び／又はS I M C A 法とを用いてクラス判別を行う定性的解析する多変量解析により、前記試料検体の成分の判別及び／又は成分の特性を判別可能とするモデルを構築する構成とした。

【選択図】 図 1

特願 2 0 0 3 - 3 7 9 5 1 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 0 0 0 0 0 0 5 7]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 1 2 月 6 日

[変更理由]

名称変更

住 所

兵庫県神戸市中央区港島南町 1 丁目 5 - 2

氏 名

財団法人新産業創造研究機構

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/016680

International filing date: 10 November 2004 (10.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-379517
Filing date: 10 November 2003 (10.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse